Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 19, No. 1, Spring. 2021, p. 1-15

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۱۵-۱

مقاله پژوهشی

بررسی خصوصیات رشدی چند گونه شبدر (.*Trifolium* spp) تحت تأثیر تنش یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

اقلیما حضرتی[1]، احمد نظامی[2*]، حمید رضا خزاعی[2]، مهدی پارسا[3]، الهه برومند رضازاده[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹

چکیده

به‌منظور بررسی تحمل به تنش یخزدگی و ویژگی‌های رشدی چند گونه شبدر (.*Trifolium* spp) پس از اعمال تنش مذکور در شرایط کنترل‌شده، آزمایشی در سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. عوامل آزمایش شامل تاریخ کاشت (۲۸ شهریور و ۲۷ مهر)، گونه‌های شبدر (قرمز *T. pratense*، سفید *T. repense*، ایرانی *T. Resupinatum* (گونه‌های پاییزه) و شبدر لاکی *T. Incarnatum* (گونه بهاره)) و دماهای یخزدگی (صفر (شاهد)، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد) بودند. در پایان دوره بازیافت درصد بقاء، دمای کشنده ۵۰ درصد گیاهان بر اساس درصد بقاء (LT_{50su})، سطح برگ و دمای کاهنده ۵۰ درصد سطح برگ ($RLAT_{50}$)، وزن خشک و دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک ($RDMT_{50}$) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور، گونه قرمز و ایرانی از درصد بقاء بالاتری برخوردار بودند. همچنین این گونه‌ها در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور LT_{50su} کمتری داشتند در صورتی‌که در تاریخ کاشت ۲۷ مهر گونه لاکی LT_{50su} کمتری داشت و شبدر سفید از نظر صفت مذکور، در هر دو تاریخ کاشت تقریباً مشابه بود. برهمکنش تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخزدگی بر سطح برگ و وزن خشک بوته در پایان دوره بازیافت معنی‌دار بود. در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور شبدر ایرانی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد کمترین کاهش سطح برگ را داشت و در تاریخ کاشت ۲۷ مهر نیز برخلاف سایر گونه‌ها در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار شاهد سطح برگ آن افزایش داشت. در کاشت ۲۸ شهریور در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد گونه‌های قرمز و ایرانی درصد بقاء بالاتری نسبت به گونه‌های سفید و لاکی داشتند. دو گونه شبدر ایرانی و سفید در هر دو تاریخ کاشت ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر، به‌ترتیب کمترین و بیشترین $RDMT_{50}$ را داشتند.

واژه‌های کلیدی: بقاء، تاریخ کاشت، خوسرمایی، دوره بازیافت، سطح برگ

مقدمه

در ایران بیش از ۲/۵ میلیون هکتار از مزارع در مناطق سرد و در معرض آسیب‌های سرمای زمستان از جمله تنش یخزدگی قرار دارند. تنش یخزدگی که یکی از مهم‌ترین تنش‌های زمستانه است، می‌تواند با ایجاد خسارات شدید از طریق صدمه به سلول‌ها و بافت‌های گیاهی، سبب از بین رفتن گیاهان زراعی گردد (Mirmohammadi Maibodi and Tarkesh Esfahani, 2004). به عقیده پژوهشگران، قرار گرفتن گیاه در معرض دماهای پایین و قبل از مواجهه با دماهای تنش‌زا، باعث افزایش تحمل به یخزدگی می‌شود (Gusta *et al.*, 2001; Thomashow, 2001). بریگر و همکاران (Bridger *et al.*, 1996) بیان داشتند که خوسرمایی در گندم (*Triticum aestivum*) سبب افزایش تحمل به یخزدگی می‌شود. در بررسی آن‌ها خوسرمایی سبب کاهش دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد بقاء به میزان ۵/۵ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار عدم خوسرمایی شد. در بررسی اثر خوسرمایی روی گیاه نخود (*Cicer arietinum*) مشاهده گردید که اعمال خوسرمایی سبب بهبود درصد بقاء و کاهش میزان تلفات در گیاه شد (Nezami *et al.*, 2007). همچنین در آزمایشی روی پنج رقم برموداگرس (.*Cynodon* spp) (میدلند، هاردی، تیفتون ۴۴، وردفیدر و گردون گیفت) و بر اساس کمترین دمای بقاء (LSTs[5])، رقم گردون گیف در اکثر مواقع بیشترین تحمل به یخزدگی را نسبت به ارقام دیگر از خود نشان داد (Jeffry *et al.*, 1995).

رشد مجدد (بازیافت) گیاهان بعد از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل شده (حدود سه تا چهار هفته) به‌عنوان یک شاخص برای تحمل به سرما استفاده شده است. در همین راستا عزیزی و همکاران

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و دانش‌آموخته‌ی دکتری زراعت، گروه اگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: nezami@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jcesc.2020.38276

5- Lowest Survival Temperatures

(Azizi *et al*., 2007) با مطالعه تحمل به یخ‌زدگی گندم، رابطه مثبت و معنی‌داری بین ارتفاع گیاه، سطح برگ و وزن خشک با LT_{50su} طی دوره بازیافت مشاهده کردند. در آزمایش نظامی و همکاران (Nezami *et al*., 2010b)، ژنوتیپ‌های تریتیکاله (*Triticale* spp.) ازنظر وزن خشک سه هفته پس از اعمال تیمار یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری داشتند، به‌نحوی‌که ژنوتیپ ET-79-17، بیشترین وزن خشک و ژنوتیپ ET-83-20 کمترین مقدار وزن خشک را دارا بودند. هنکبای و همکاران (Henkeby *et al*., 2006) نیز با بررسی چندین رقم یونجه و شبدر یک‌ساله گزارش کردند که با کاهش دما از ۱- تا ۱۳- درجه سانتی‌گراد (فواصل سه درجه) ماده خشک گیاه کاهش معنی‌داری داشت و گیاهانی که LT_{50} کمتری داشتند از تولید ماده خشک بیشتری نیز پس از رشد مجدد برخوردار بودند.

شبدرها (*Trifolium* spp.) با داشتن حدود ۳۰۰ گونه از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای به‌شمار می‌روند. در ایران شبدر بعد از یونجه (*Medicago sativa*)، مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دولپه است که سطح زیر کشتی حدود ۷۰ هزار هکتار را به خود اختصاص داده است (Zamanian and Asadi, 2004). نتایج بررسی‌های پژوهشگران نشان داده است که کشت پاییزه شبدر می‌تواند از طریق افزایش طول دوره رشدی سبب بهبود عملکرد این گیاه گردد. زمانیان و اسدی (Zamanian and Asadi, 2004) در طی سه سال، اثر فصل کاشت بر میزان تولید علوفه گونه‌های شبدر را مطالعه نموده و بیان داشتند که میانگین عملکرد علوفه خشک گونه‌های شبدر در کاشت پاییزه، حدود ۱۵ درصد بیش از کاشت بهاره بود. همچنین چابک و اسپهبدی (Chabok and Espahbodi, 2011) اظهار داشتندکه تولید علوفه شبدر برسیم در مازندران در پنج تاریخ کاشت ۱۰ مهر، ۲۵ مهر، ۱۰ آبان، ۲۵ آبان و ۱۰ آذر دارای تفاوت معنی‌داری بود، به‌طوری‌که تاریخ کاشت‌های ۱۰ و ۲۵ مهر با ۲/۰۴ و ۲/۱۱ تن علوفه خشک دارای بیشترین میزان تولید بودند و تولید علوفه در تاریخ کشت‌های بعد از ۲۵ مهر کاهش یافت.

علی‌رغم این‌که ایران از مراکز اصلی تنوع گونه‌های شبدر بوده و این گیاه از جمله گیاهان علوفه‌ای ارزشمند به شمار می‌رود، ولی اطلاعات چندانی در مورد تحمل به سرمای گونه‌های ایرانی این گیاه در دست نیست. با ارزیابی میزان تحمل به سرما و یخزدگی این گیاه می‌توان تاریخ کاشت مناسب را جهت حصول حداکثر عملکرد تعیین نمود. لذا این مطالعه با هدف بررسی میزان تحمل به یخزدگی چهار گونه شبدر از طریق ارزیابی درصد بقاء و رشد مجدد گیاهان پس از اعمال تنش صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل آزمایش عبارت بودند از دو تاریخ کاشت (۲۸ شهریور و ۲۷ مهر)، چهار گونه شبدر (شبدر قرمز *T. pratense*، شبدر سفید *T. repense*، شبدر ایرانی *T. resupinatum* و شبدر لاکی *T. incarnatum*) و هشت تیمار دمایی (شامل دماهای صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد).

کشت گیاهان در دو تاریخ ۲۸ شهریور و ۲۷ مهرماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. به این منظور ابتدا تعداد ۳۰-۲۰ بذر در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی مخلوطی از نسبت مساوی خاک، ماسه و خاک‌برگ کشت و بعد از استقرار، تعداد آن‌ها به ۱۵ بوته در هر گلدان تقلیل داده شد. گیاهان حاصل از تاریخ کاشت ۲۸ شهریور به مدت چهار ماه و گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهرماه به مدت سه ماه در شرایط آب و هوایی طبیعی رشد یافته و خوسرمایی شدند. در طی این دوران جهت جلوگیری از از بین رفتن گیاهان، در شب‌هایی با دمای کمتر از ۴- درجه سانتی‌گراد، گیاهان به شاسی سرد منتقل شدند. آبیاری گیاهان در مواقع مورد نیاز و مراقبت‌های لازم شامل کنترل آفات و امراض انجام شد.

یک روز قبل از اعمال دماهای آزمایش، گلدان‌ها آبیاری و گیاهان هر دو تاریخ کاشت در تاریخ ۲۸ دی ماه به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. در این زمان گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور در مرحله رشدی ۱۰-۸ برگی و گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر در مرحله ۵-۴ برگی قرار داشتند. دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. این وضعیت شرایط را برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Murray, 1988). به‌منظور جلوگیری از پدیده فراسرمایی و ایجاد هستک یخ در گیاهان، در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد اسپری INAB[1] روی نمونه‌ها انجام شد به‌طوری‌که سطح گیاهان با قشری از این محلول پوشانده و خیس شد (Lindow, 1982). جهت ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهان در هر تیمار دمایی (صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد) به مدت یک ساعت نگه داشته و سپس برای جلوگیری از ذوب شدن سریع یخ به اتاقک رشد سرد با دمای ۲±۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در آنجا نگهداری شدند.

برای بازیافت گیاهان و تعیین درصد بقاء، گلدان‌ها به گلخانه انتقال یافته و پس از چهار هفته درصد بقاء در آن‌ها ارزیابی شد. در طول این مدت آبیاری گیاهان و نیز مراقبت‌های لازم شامل کنترل آفات (از طریق نصب کارت‌های حاوی چسب تله حشرات) انجام

1- Ice Nucleation Active Bacteria

گرفت. درصد بقاء گیاهان از طریق شمارش تعـداد بوتـه زنـده در هـر گلدان و با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Cardona, 1997).

(۱) ۱۰۰× (تعداد بوته قبل از یخزدگی/تعداد بوته چهار هفته بعد از یخزدگی) = درصد بقاء

بازیافت گیاهان نیز از طریق اندازه‌گیری صفاتی نظیر سطح بـرگ و وزن خشک (پس از ۴۸ سـاعت قـرار گـرفتن نمونـه‌هـا در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد) تعیین شد.

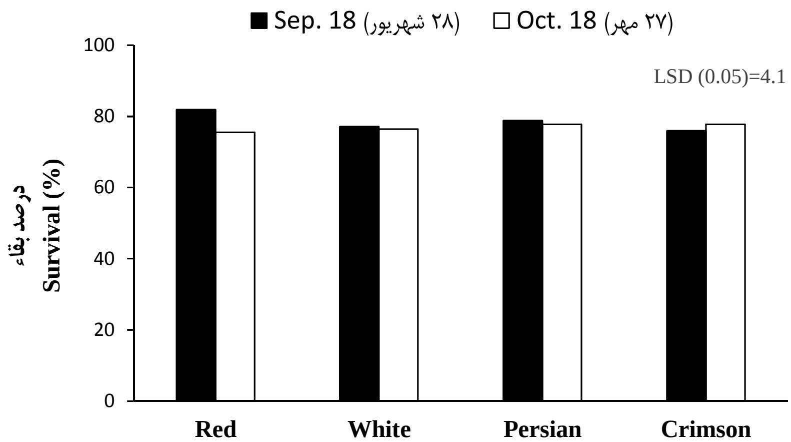
جدول ۱- منبع تغییرات، درجه آزادی و میانگین مربعات (MS) درصد بقاء در گیاه شبدر تحت تأثیر تیمارهای یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 1- Source of variations, degrees of freedom and mean squares of survival percentage in clover species as affected by freezing stress in controlled conditions

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	درصد بقاء Survival percentage
تاریخ کاشت Planting Date	1	57[ns]
گونه Species	3	10 [ns]
تاریخ کاشت ×گونه Planting Date× Species	3	203*
دما Temperature	7	34009*
تاریخ کاشت × دما Planting Date× Temp.	7	317*
گونه × دما Species× Temp.	21	177*
تاریخ کاشت×گونه×دما Planting Date× Species× Temp.	21	179*
خطا Error	128	66
کل Total	191	
ضریب تغییرات CV (%)		12

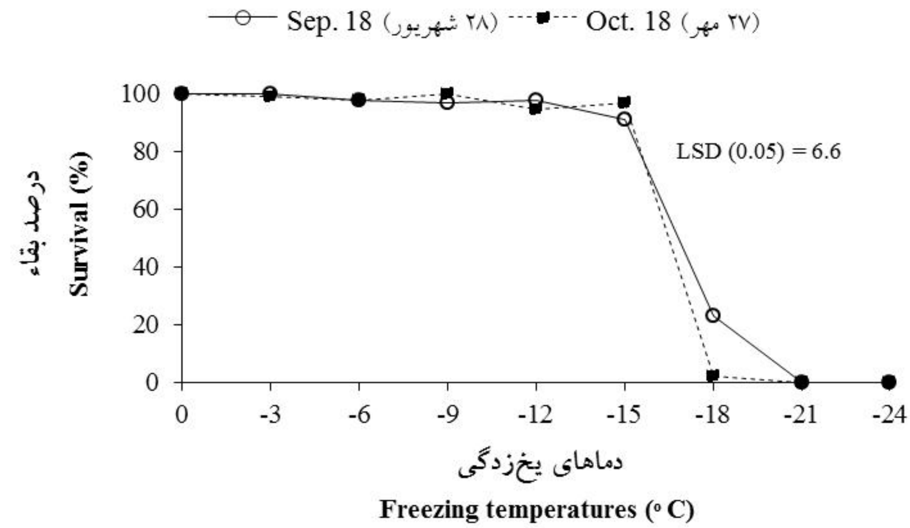
ns و *: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج درصد

ns and *: non- significant and significant at %5 level of probability, respectively

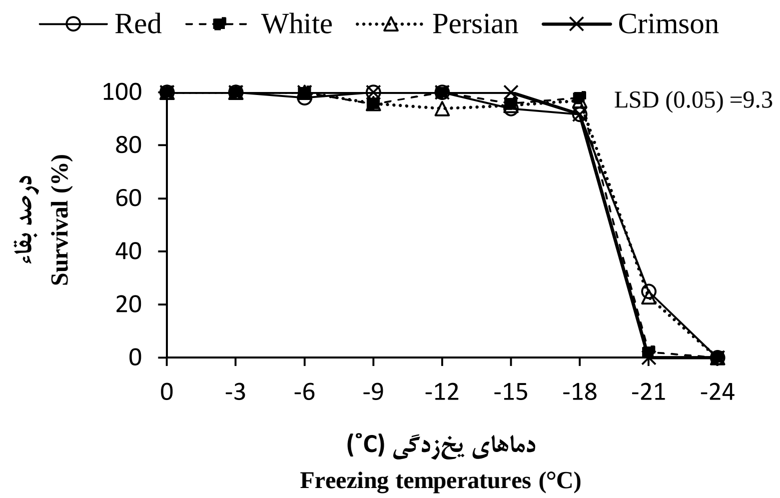


شکل ۱- برهمکنش تاریخ کاشت و گونه بر درصد بقاء گیاه شبدر تحت شرایط کنترل‌شده

Figure 1- Interaction of planting date and species on Survival percentage of clover under controlled conditions



شکل ۲- برهمکنش تاریخ کاشت و دماهای یخزدگی بر درصد بقاء گیاه شبدر در شرایط کنترل‌شده
Figure 2- Interaction of planting date and freezing temperature on survival percentage of clover under controlled conditions



شکل ۳- درصد بقاء گونه‌های شبدر در دماهای مختلف یخزدگی در شرایط کنترل شده
Figure 3- Survival percentage of clover species in different freezing temperatures under controlled conditions

درجه حرارت ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد بقاء (LT_{50SU}[1])، دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک گیاهان ($RDMT_{50}$[2]) و دمای کاهنده ۵۰ درصد سطح برگ ($RLAT_{50}$[3]) نیز پس از ترسیم نمودار داده‌های هر صفت در مقابل دماهای یخزدگی و تعیین دمایی که سبب ۵۰ درصد کاهش این صفات نسبت به تیمار شاهد شده بود، مشخص شد (Nezami *et al*., 2010a).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و رسم شکل‌ها توسط نرم‌افزار Excel صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

درصد بقاء شبدر تحت تأثیر تاریخ کاشت و گونه قرار نگرفت، اما برهمکنش این عوامل بر درصد بقاء معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌طوری‌که با تأخیر در کاشت از شهریور به مهر ماه، درصد بقاء در شبدر قرمز ۷/۸ درصد کاهش یافت، درحالی‌که در شبدر لاکی این شاخص ۲/۵ درصد افزایش نشان داد (شکل ۱).

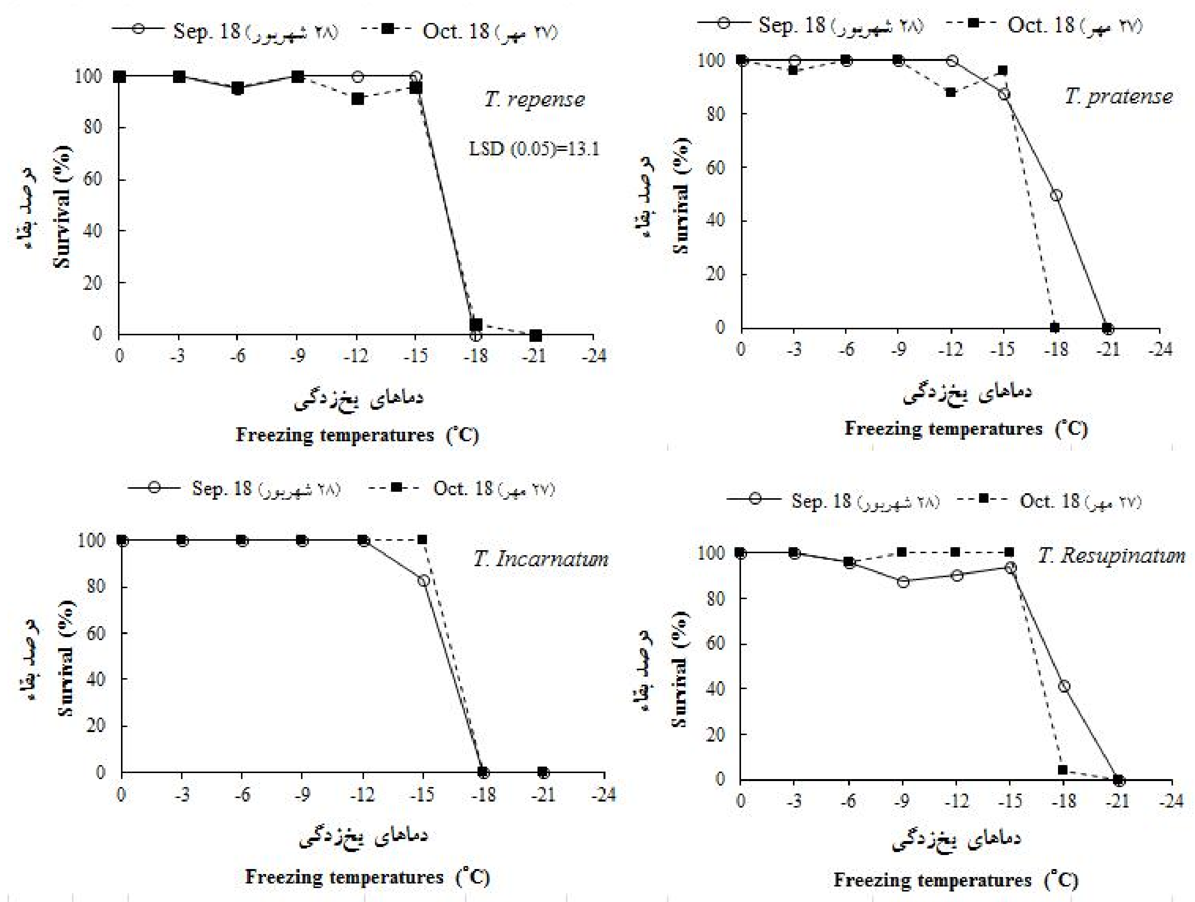
1- Lethal Temperature50 According to The Plant Survival Percentage
2- Reduced Dry Matter Temperature50
3- Reduced Leaf Area Temperature50

برهمکنش تاریخ کاشت و دما بر درصد بقاء معنی‌دار بود (جدول ۱). با وجود این‌که درصد بقاء گیاهان هر دو تاریخ کاشت تا دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد چندان تحت تأثیر قرار نگرفت، ولی در دماهای کمتر، درصد بقاء گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر با شدت بیشتری نسبت به گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور کاهش یافت (شکل ۲) که به نظر می‌رسد به دلیل خوسرمایی مناسب‌تر در گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور باشد.

درصد بقاء گونه‌های شبدر به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت (جدول ۱). با وجود این‌که تا دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد بقاء گونه‌های مورد بررسی نسبتاً مشابه بود ولی با کاهش بیشتر دما، درصد بقاء به‌طور متفاوتی کاهش یافت (شکل ۳). درصد بقاء شبدر قرمز و ایرانی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۲۵ و ۲۲/۹ درصد و شبدر سفید ۲/۱ درصد بود، در حالی که شبدر لاکی در این دما کاملاً از بین رفته بود.

سونسن و همکاران (Swensen, 1980) با بررسی اثر تنش یخزدگی بر سه ژنوتیپ نخود فرنگی (*Pisum sativum*) (یک ژنوتیپ بهاره و دو ژنوتیپ زمستانه) مشاهده کردند که ژنوتیپ بهاره در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد، چهار هفته بعد از تیمار یخزدگی حدود سه درصد بقاء داشت، در حالی‌که درصد بقاء ژنوتیپ‌های زمستانه در این دما بیش از ۶۵ درصد بود. همچنین در دمای ۹- درجه سانتی‌گراد ژنوتیپ بهاره از بین رفت، درحالی‌که ژنوتیپ‌های زمستانه ۳۵ درصد بقاء داشتند.

درصد بقاء گیاهان به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر برهمکنش تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخزدگی قرار گرفت (جدول ۱). دو گونه شبدر لاکی و سفید در هر دو تاریخ کاشت تا دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد بقاء مناسبی داشتند ولی با کاهش دما به ۱۸- درجه سانتی‌گراد کاملاً از بین رفتند، درصورتی‌که دو گونه شبدر قرمز و ایرانی در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب دارای ۵۰ و ۴۲ درصد بقاء بودند، درحالی‌که در تاریخ کاشت ۲۷ مهر در این دما از بین رفتند (شکل ۴). لذا به نظر می‌رسد که دو گونه شبدر قرمز و ایرانی از تحمل به سرمای بیشتری نسبت به گونه‌های دیگر برخوردار باشند.



شکل ٤- برهمکنش تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخزدگی بر درصد بقاء گیاه شبدر تحت شرایط کنترل‌شده

Figure 4- Interaction of planting date, species and freezing temperatures on survival percentage in clover under controlled conditions

از نظر LT_{50su} بین تاریخ‌های کاشت تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳) و گیاهان کشت ۲۸ شهریور ماه، LT_{50su} کمتری نسبت به گیاهان کشت شده در ۲۷ مهرماه داشتند (جدول ۴). به نظر می‌رسد طول دوره خوسرمایی بیشتر در گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور سبب درصد بقاء بالاتر در آن‌ها شده است. در شرایط طبیعی، خوسرمایی در پاییز زمانی که دما بالاتر از نقطه انجماد است انجام می‌گیرد. فرآیند خوسرمایی در گیاهان متحمل، مکانیزم‌های کارآمد مورد نیاز برای تحمل به یخ‌زدگی را فعال می‌کند که این امر تعیین‌کننده ظرفیت آن‌ها در بقای زمستانه است. در طول دوره‌ای که گیاهان در معرض دمای پایین قرار دارند، تعدادی از فرآیندهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در گیاه تغییر می‌کند که این تغییرات به‌طور منظم به‌واسطه دمای پایین، بیشتر در سطح بیان ژن انجام می‌گیرد (Ouellet and Charron, 2013). رایف و زینلی (Rife and Zeinali, 2003) با مطالعه تأثیر دوره‌های مختلف خوسرمایی بر تحمل به یخ‌زدگی سه رقم کلزا (*Brassica napus* L.)، نقش طول دوره خوسرمایی را در ارقام پاییزه و بهاره حائز اهمیت دانستند. همچنین نظامی و همکاران (Nezami *et al*., 2007) بیان داشتند که خوسرمایی سبب بهبود LT_{50su} در نخود شد.

جدول ۳- منبع تغییرات، درجه آزادی و میانگین مربعات (MS) LT_{50su}، $RDMT_{50}$ و $RLAT_{50}$ گیاه شبدر پس از اعمال تنش یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 3- Source of variations, degrees of freedom and mean squares of LT_{50su}, $RDMT_{50}$ and $RLAT_{50}$ in clover species as affected by freezing stress in controlled conditions

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS $RDMT_{50}$	 $RLAT_{50}$	 LT_{50su}
تاریخ کاشت Planting date	1	0.5^{ns}	7.1^{ns}	1.8*
گونه Species	3	6.6*	25.7*	1.3*
تاریخ کاشت×گونه Planting date× Species	3	3.5*	5.8^{ns}	1.3*
خطا Error	16	0.4	2.2	0.4

ns و *: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج درصد

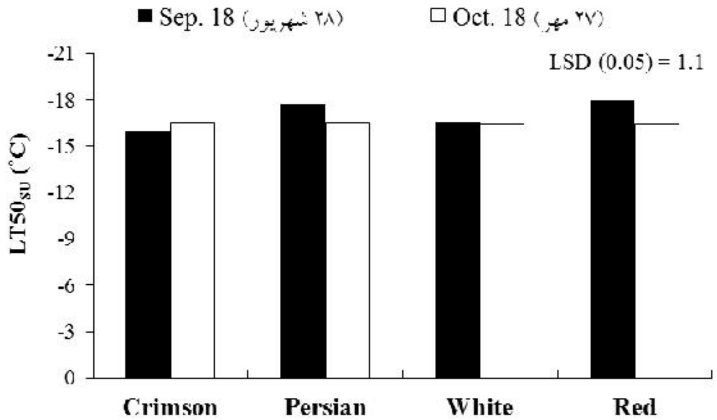
ns and *: non- significant and significant at %5 level of probability, respectively

جدول ٤- اثر تاریخ کاشت و گونه بر LT_{50su}، $RDMT_{50}$ و $RLAT_{50}$ گیاه شبدر پس از اعمال تنش یخ‌زدگی تحت شرایط کنترل‌شده

Table 4- Effect of planting date and species on LT_{50su}, $RDMT_{50}$ and $RLAT_{50}$ (°C) as affected by freezing stress in controlled conditions

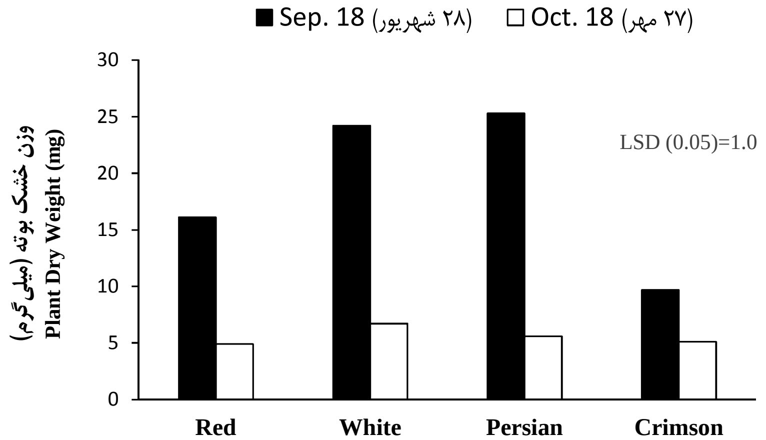
Treatment	LT_{50su}	$RLAT_{50}$	$RDMT_{50}$
تاریخ کاشت Planting date			
۲۸ شهریور Sep. 18	-17.0	-14.2	-15.0
۲۷ مهر Oct. 18	-16.5	-15.3	-15.7
LSD (0.05)	0.9	ns	ns
گونه Species			
قرمز Red	-17.2	-12.1	-15.8
سفید White	-16.5	-14.4	-14.1
ایرانی Persian	-17.1	-17.0	-16.5
لاکی Crimson	-16.2	-15.4	-16.1
LSD (0.05)	1.0	1.8	0.8

در بــین گونــه‌هــای شــبدر از نظــر LT_{50su} تفــاوت معنــی‌داری (P≤0.05) وجود داشت (جدول ۳) و مقدار این شاخص در شبدر قرمـز و ایرانی پایین‌تر از گونه‌های سفید و لاکی بود (جدول ۴). بـرهمکنش تاریخ کاشت و گونه بر LT_{50su} معنی‌دار بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که با تأخیر در کاشت از ۲۸ شهریور ماه به ۲۷ مهرماه، LT_{50su} در دو گونـه قرمز و ایرانی افزایش و در گونه لاکی کاهش یافت. در شـبدر سـفید تفاوتی از نظر این شاخص در بین دو تاریخ کاشت دیده نشـد (شـکل ۵). در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور گونه‌های پاییزه (قرمز، سفید و ایرانی) از LT_{50su} کمتری برخوردار بودند، درحالی‌که گونـه بهـاره (لاکـی) در کاشت ۲۷ مهرماه LT_{50su} کمتری داشت؛ بنابراین بـه نظـر مـی‌رسـد گونه لاکی در کاشت دوم تحمل بـه سـرمای بـالاتری را نشـان داده است که با مطالعه اندرسون و تالیافرو (Anderson and Taliaferro, 1995) مبنی بر تحمل به سرمای بهتر گیاهان در مراحل رشدی پایین مطابقت دارد؛ اما گونه‌های پاییزه با خوسرمایی مناسب در کاشـت ۲۸ شهریورماه نسبت به کاشت۲۷ مهرماه، توانایی بقاء مناسب‌تری نسبت به گونـه بهـاره داشـتند. اولـت و شـارون (Ouellet and Charron, 2013) اظهار داشتند که تحمل به یخ‌زدگی یک صفت چند ژنی است که نیازمند ظرفیت برنامه ژنتیکی در تمام زمستان است، به این مفهوم که برخی جنس‌ها و گونه‌های یک جنس ظرفیت متفاوتی نسـبت بـه تحمل به یخ‌زدگی دارند.



شکل ۵- برهمکنش تاریخ کاشت و گونه بر LT_{50su} در گیاه شبدر تحت شرایط کنترل‌شده

Figure 5- Interaction of planting date and species on $LT50_{su}$ in clover under controlled conditions



شکل ٦- اثر تاریخ کاشت بر سطح برگ گونه‌های شبدر سه هفته پس از تنش یخ‌زدگی

Figure 6- Effect of planting date on leaf area of clover species three weeks after freezing stress

برهمکنش تاریخ کاشت و گونـه بـر سـطح بـرگ در پایـان دوره بازیافت معنی‌دار بود (جدول ۵). هرچند که سطح برگ گیاهان کاشـت دوم کمتر از کاشت اول بود، ولی درصد کاهش سطح برگ تحت تأثیر تاریخ کاشت در گونه‌های مختلف متفاوت بود. بیشترین درصد کاهش در شبدر ایرانی (۷۵ درصد) و کمترین آن در شبدر لاکـی (۴۲ درصـد) مشاهده شد (شکل ۶).

جدول ۵- منبع تغییرات، درجه آزادی و میانگین مربعات (MS) سطح برگ و وزن خشک شبدر تحت تأثیر تنش یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده
Table 5- Source of variations, degrees of freedom and mean squares of leaf area and dry matter in clover species as affected by freezing stress in controlled conditions

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	سطح برگ در بوته Leaf area per plant	وزن خشک در بوته Dry matter per plant
تاریخ کاشت Planting date	1	6739*	294819*
گونه Species	3	792*	14332*
تاریخ کاشت ×گونه Planting date× Species	3	558*	10217*
دما Temperature	7	299*	8942*
تاریخ کاشت × دما Planting date× Temp.	7	291*	14183*
گونه × دما Species× Temp.	21	74.2*	2661*
تاریخ کاشت×گونه×دما Planting date× Species× Temp.	21	52.9*	2364*
تعداد بوته (کوواریت) Plant number (Covariate)	1	103	248
خطا Error	127	2.8	114
ضریب تغییرات CV (%)		13.7	13.9

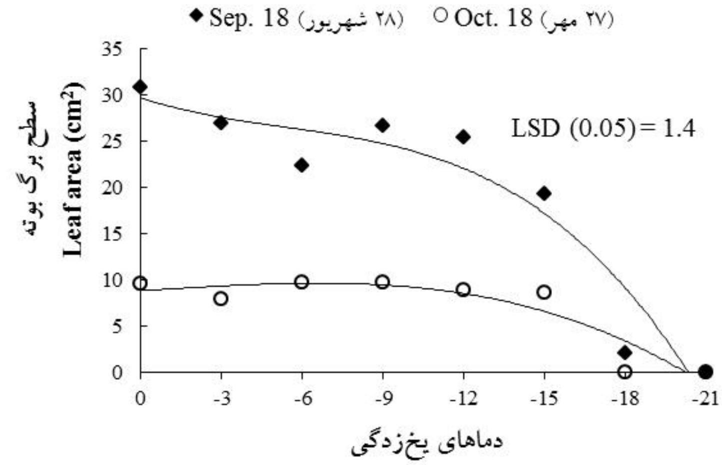
ns و *: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج درصد
ns and *: non- significant and significant at %5 level of probability, respectively

برهمکنش تاریخ کاشت و دماهای یخ‌زدگی بر سطح برگ در بوته معنی‌دار بود (جدول ۵). هرچند که در گیاهان هر دو تاریخ کاشت، کاهش دما سبب کاهش سطح برگ گیاهان گردید، ولی درصد کاهش این صفت متفاوت بود، به‌نحوی‌که در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور، کاهش سطح برگ در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد حدود ۳۸ درصد و برای گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر حدود ۱۰ درصد بود. کاهش سطح برگ در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد نیز حدود ۹۳ درصد بود، اما گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر هیچ‌گونه برگی نداشتند (در دمای مذکور هیچ‌یک از گیاهان زنده نماندند) (شکل ۷).

درصد کاهش سطح برگ با کاهش دماهای یخ‌زدگی در گونه‌های مختلف شبدر متفاوت بود. گونه قرمز، سفید و لاکی با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد، به‌ترتیب حدود ۲۸، ۵۸ و ۲۴ درصد کاهش سطح برگ داشتند، اما در گونه ایرانی نه تنها کاهش سطح برگ مشاهده نشد، بلکه مقدار آن حدود هفت درصد افزایش نشان داد (شکل ۸). گیاهان عالی که در معرض تغییرات شرایط محیطی مانند دمای پایین قرار می‌گیرند، ناچار به تنظیم ظرفیت فتوسنتزی خود هستند (Huner *et al.*, 2013). در شرایط تنش یخ‌زدگی، خسارت به گیرنده‌های کلروپلاستی که در ترکیب با رنگ‌دانه‌ها (عموماً کارتنوئیدها) و پروتئین‌ها هستند، موجب توقف و از هم‌گسیختگی ظرفیت فتوسنتزی شده که سبب می‌شود پس از پایان تنش یخ‌زدگی، میزان فتوسنتز کاهش یافته و توسعه سطح برگ نیز کاهش یابد (Ouellet and Charron, 2013).

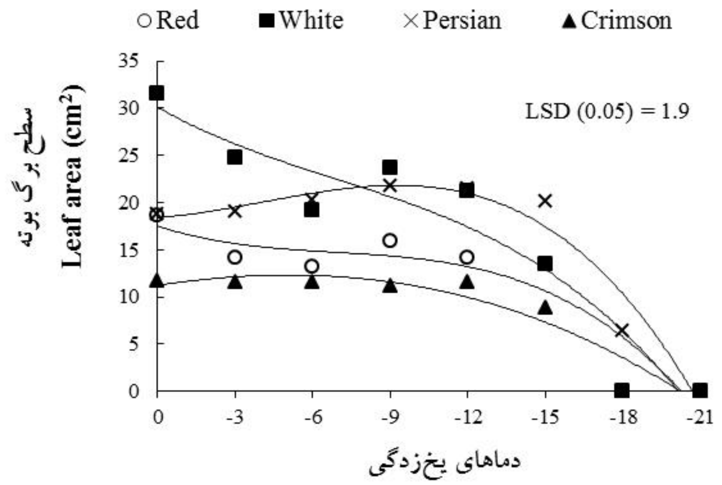
برهمکنش تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخ‌زدگی بر سطح برگ گیاهان در پایان دوره بازیافت معنی‌دار بود (جدول ۵)، به‌طوری‌که در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور، کاهش دما از صفر به ۱۸- درجه سانتی‌گراد، سبب کاهش حدوداً ۹۸ و ۴۸ درصدی سطح برگ در گونه‌های قرمز و ایرانی شد، اما در شرایط مشابه گونه‌های سفید و لاکی از بین رفتند. همچنین در گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد کاهش سطح برگ در گونه‌های قرمز، سفید و لاکی به‌ترتیب حدود ۶، ۳۳ و ۲ درصد بود، اما گونه ایرانی در شرایط مشابه نه تنها کاهش سطح برگ نداشت، بلکه حدود ۱۲ درصد نیز افزایش سطح برگ نشان داد (شکل ۹).

اثر تاریخ کاشت بر دمای کاهنده ۵۰ درصد سطح برگ معنی‌دار نبود (جدول ۳)، ولی اثر گونه بر میانگین این شاخص معنی‌دار بود و گونه‌های ایرانی و قرمز به‌ترتیب کمترین و بیشترین $RLAT_{50}$ را دارا بودند (جدول ۴).



شکل ۷- برهمکنش تاریخ کاشت و دماهای یخ‌زدگی بر سطح برگ شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 7- Interaction of planting date and freezing temperatures on leaf area of clover at the end of the recovery period



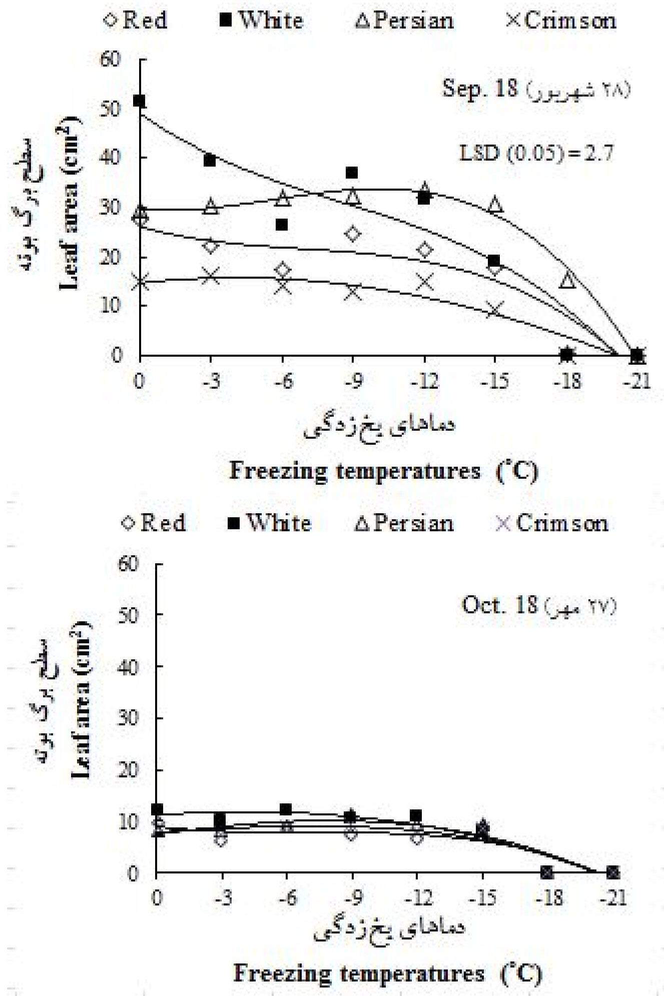
شکل ۸- برهمکنش گونه و دماهای یخ‌زدگی بر سطح برگ بوته در شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 8- Interaction of species and freezing temperatures on leaf area of clover at the end of the recovery period

برهمکنش تاریخ کاشت و گونه بر وزن خشک بوته معنی‌دار بود (جدول ۵). علی‌رغم این‌که وزن خشک بوته در گیاهان کاشت ۲۷ مهر کمتر از کاشت ۲۷ شهریور بود، اما درصد کاهش وزن خشک هر یک از گونه‌ها متفاوت بود، به‌نحوی‌که کمترین درصد کاهش وزن خشک بوته در شبدر لاکی (۶۴ درصد) و بیشترین آن در شبدر سفید (۷۷ درصد) مشاهده شد (شکل ۱۰).

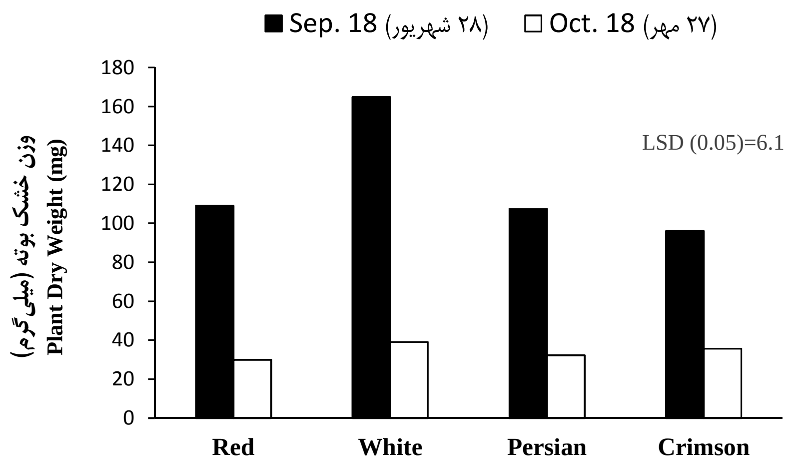
درصد کاهش وزن خشک بوته در دماهای یخ‌زدگی بسته به تاریخ کاشت متفاوت بود، به‌طوری‌که در کاشت ۲۸ شهریور، با کاهش دما از صفر به ۱۵- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد، وزن خشک بوته به‌ترتیب حدود ۲۵ و ۸۹ درصد کاهش داشت. این درحالی بود که گیاهان کاشت ۲۷ مهر با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد، ۱۲ درصد کاهش وزن خشک داشتند و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد از بین رفتند (شکل ۱۱).

میزان کاهش وزن خشک بوته در دماهای یخ‌زدگی در پایان دوره بازیافت بسته به گونه متفاوت بود، به‌طوری‌که با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد، وزن خشک در هر یک از شبدرهای قرمز، سفید، ایرانی و لاکی به‌ترتیب حدود ۳، ۴۲، ۳۰ و ۱ درصد کاهش یافت. همچنین با کاهش دما از صفر به ۱۸- درجه سانتی‌گراد، گونه‌های قرمز و ایرانی به‌ترتیب حدود ۹۴ و ۶۵ درصد کاهش وزن خشک داشتند، ولی گونه‌های سفید و لاکی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد زنده نماندند (شکل ۱۲).



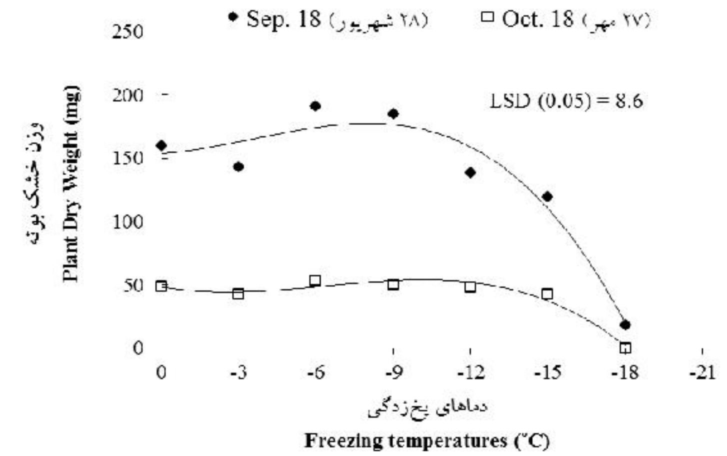
شکل ۹- برهمکنش تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخ‌زدگی بر سطح برگ شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 9- Interaction of planting date, species and freezing temperatures on leaf area of clover at the end of the recovery period



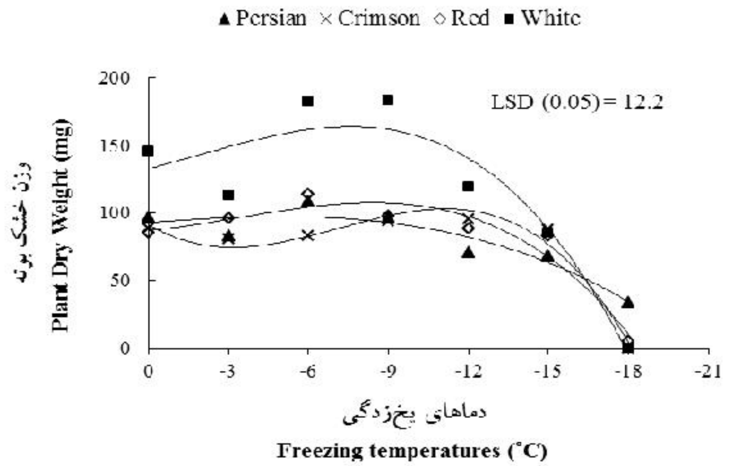
شکل ۱۰- برهمکنش تاریخ کاشت و گونه بر وزن خشک شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 10- Interaction of planting date and species on dry weight of clover at the end of the recovery period



شکل ۱۱- برهمکنش تاریخ کاشت و دماهای یخ‌زدگی بر وزن خشک بوته شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 11- Interaction of planting date and freezing temperatures on plant dry weight of clover at the end of the recovery period

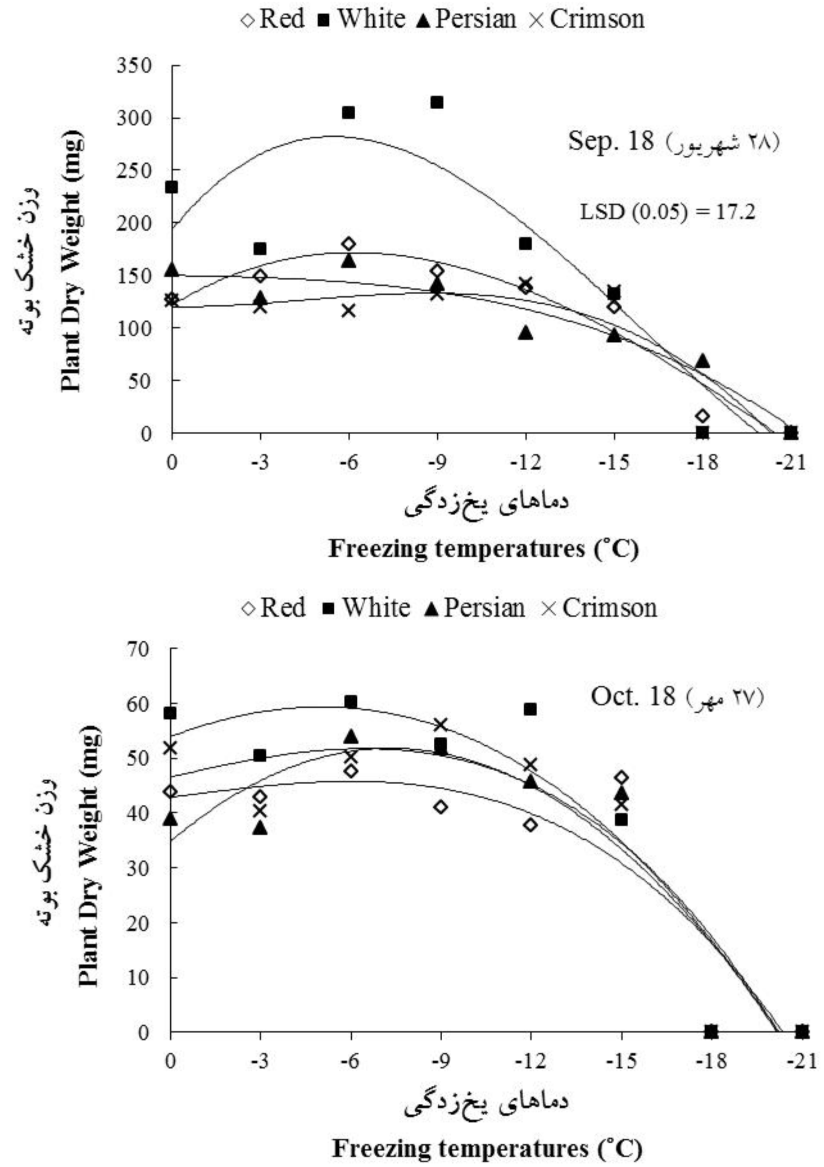


شکل ۱۲- برهمکنش گونه و دماهای یخ‌زدگی بر وزن خشک بوته شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 12- Interaction of species and freezing temperatures on plant dry weight of clover at the end of the recovery period

برهمکنش تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخ‌زدگی بر وزن خشک بوته در پایان دوره بازیافت معنی‌دار بود (جدول ۵)، به‌طوری‌که در گیاهان کاشت اول با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد، وزن خشک بوته در شبدرهای قرمز، سفید و لاکی به‌ترتیب حدود ۶، ۴۳ و ۴۰ درصد کاهش و شبدر ایرانی ۷ درصد افزایش داشت. همچنین با کاهش دما از صفر به ۱۸- درجه سانتی‌گراد، وزن خشک بوته در شبدرهای قرمز و ایرانی به‌ترتیب حدود ۸۷ و ۵۶ درصد کاهش داشت، درحالی‌که شبدرهای سفید و لاکی دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد را تحمل نکردند. همچنین در گیاهان کاشت ۲۷ مهر، وزن خشک بوته در شبدرهای قرمز و ایرانی در دمای ۱۵- نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب حدود ۶ و ۱۲ درصد افزایش داشت، درحالی‌که وزن خشک شبدرهای سفید و لاکی به‌ترتیب حدود ۵۴ و ۲۰ درصد کاهش داشت (شکل ۱۳).

اثر تاریخ کاشت بر $RDMT_{50}$ معنی‌دار نبود (جدول ۳)، ولی بین گونه‌ها از نظر $RDMT_{50}$ تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) وجود داشت، به‌طوری‌که شبدر ایرانی و شبدر لاکی کمترین و شبدرهای قرمز و سفید بیشترین $RDMT_{50}$ را به خود اختصاص دادند. نظامی و همکاران (۱۳۸۵) در طی مطالعه‌ای روی نخود اظهار داشتند که علاوه بر شاخص LT_{50} می‌توان از شاخص $RDMT_{50}$ نیز برای ارزیابی میزان خسارت سرما در گیاه و رشد مجدد آن استفاده نمود. برهمکنش تاریخ کاشت و گونه نیز بر $RDMT_{50}$ معنی‌دار بود، به‌نحوی‌که در شبدرهای قرمز، ایرانی و لاکی با تغییر تاریخ کاشت از اواخر شهریور به اواخر مهرماه $RDMT_{50}$ افزایش یافت، اما در شبدر سفید با تغییر تاریخ کاشت از ۲۸ شهریور به ۲۷ مهرماه این صفت کاهش داشت (شکل ۱۴).

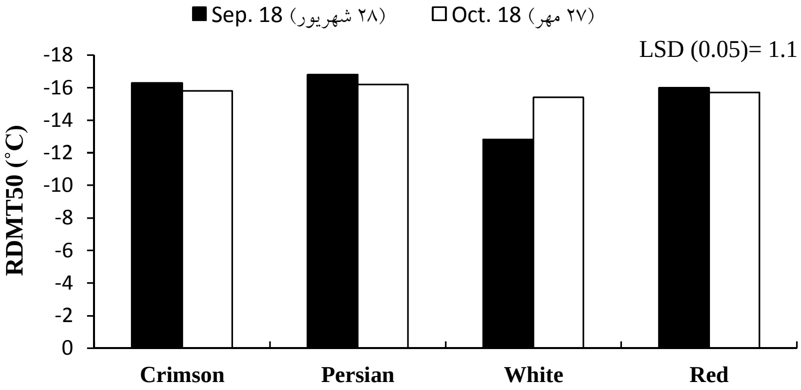


شکل ۱۳- برهمکنش گونه، تاریخ کاشت و دماهای یخ‌زدگی بر وزن خشک بوته شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 13- Interaction of species, planting date and freezing temperatures on plant dry weight of clover at the end of the recovery period

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که بر اساس شاخص‌های درصد بقاء و $LT50_{su}$، دو گونه شبدر قرمز و ایرانی از تحمل به یخ‌زدگی بهتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار بودند. از نظر صفات مربوط به رشد مجدد شامل سطح برگ بوته، $RLAT_{50}$، وزن خشک بوته و $RDMT_{50}$ بیشترین توانایی بازیافت در گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر ماه مشاهده شد، همچنین گونه‌های یک‌ساله (ایرانی و لاکی) نسبت به شبدرهای چندساله (قرمز و سفید) دارای $RLAT_{50}$ و $RDMT_{50}$ کمتر و تحمل به یخ‌زدگی بالاتری بودند.



شکل ۱٤- برهمکنش تاریخ کاشت و گونه بر $RDMT_{50}$ در شبدر در پایان دوره بازیافت

Figure 14- Interaction of planting date and species on $RDMT_{50}$ of clover at the end of the recovery period

References

1. Anderson, J. A., and Taliaferro, C. M. 1995. Laboratory freeze tolerance of field grown forage Bermuda grass cultivars. Agronomy Journal 87: 1017-1020.
2. Azizi, H., Nezami, A., Nassiri Mahallati, M., and Khazaie, H. 2007. Evaluation of cold tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under controlled conditions. Iranian Journal of Field Crops Research 5 (1): 107-120. (in Persian with English abstract).
3. Bridger, G. M., Falk, D. E., Mckersie, B. D., and Smith, D. L. 1996. Crown freezing tolerance and field winter survival of winter cereals in eastern Canada. Crop Science 36: 150-157.
4. Cardona, C. A., Duncan, R. R., and Lindstrom, O. 1997. Low temperature tolerance assessment in paspalum. Crop Science 37: 1283-1291.
5. Chabok, Kh., and Espahbodi, K. 2011. Seeding dates effects on seed and forage production of Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) in Mazandaran. Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi). No: 93. pp: 1-7. (in Persian with English abstract).
6. Gusta, L. V., O'Connor, B. J., Gao, Y. P., and Jana, S. 2001. A re-evaluation of controlled freeze-tests and controlled environment hardening conditions to estimate the winter survival potential of hardy winter wheat. Canadian Journal of Plant Science 80: 241-246.
7. Henkeby, M., Antolin, M. C., and Sanchez-Diaz, M. 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. Environmental and Experimental Botany 55: 305-314.
8. Huner, N. P. A, Bode, R., and Dahal, K. 2013. Shedding some light on cold acclimation, cold adaptation, and phenotypic plasticity. Botany 91 (3): 127-136.
9. Jeffrey, A. A., and Charles, M. T. 1995. Laboratory freeze tolerance of field-grown forage Bermuda grass cultivars. Agronomy Journal 87: 1017-1020.
10. Lindow, S. E., Arny, D. C., and Upper, C. D. 1982. Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. Plant Physiology 70: 1084-1089.
11. Mirmohammadi Maibodi, A. M., and Tarkesh Esfahani, S. 2004. Physiological and Breeding Aspects of Cold and Freezing Stress in Crops. Golbon Press. 223 pp. (in Persian).
12. Murray, G. A., Eser, D., Gusta, L. V., and Eteve, G. 1988. Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. p. 831-843. In the R.J. Summerfield (Ed.) World crops: cool season food legumes. Kluwer Academic Publishers A. the Netherlands.
13. Nezami, A., Bagheri, A., Rahimian, H., Kafi, M., and Nassiri Mahallati, M. 2007. Evaluation of Freezing Tolerance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes under Controlled Conditions. Journal of Water and Soil Sciences 10 (4): 257-269. (in Persian with English abstract).
14. Nezami, A., Hajmohammadnia Ghalibaf, K., and Kamandi, A. 2010a. Evaluation of freezing tolerance of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars under controlled conditions. Environmental Stresses in Crop Sciences 3 (2): 177-187. (in Persian with English abstract).
15. Nezami, A., Soleimani, M. R., Ziaee, M., Ghodsi, M., and Bannayan Aval, M. 2010b. Evaluation of freezing tolerance of hexaploid triticale genotypes under controlled conditions. Notulae Scientia Biologicae 2: 114-120.
16. Ouellet, F., and Charron, J. B. 2013. Cold Acclimation and Freezing Tolerance in Plants. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020093. pub2
17. Rife, C. L., and Zeinali, H. 2003. Cold tolerance in oilseed rape over varying acclimation durations. Crop Science 43: 96-100.

18. Swensen, J. B. 1980. Development of freezing tolerance and changes in tissue moisture during hardening of *Pisumsativum* L. and *Pisumsativum* subsp. *Arvense* L. MSc thesis, University of Idaho, USA.
19. Thomashow, M. F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! Plant Physiology. 125: 89-93.
20. Zamanian, M., and Asadi, H. 2004. Effects of seed rate, planting date and planting method on morphological traits and forage yield of Persian clover. Iranian Journal of Crop Sciences 7 (3): 241-251. (in Persian with English abstract).

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 19, No. 1, Spring. 2021, p. 1-15

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۱۵-۱

Evaluation of Growth Characteristics of Four Clover Species (*Trifolium*s pp.) Affected by Freezing Stress under Controlled Conditions

E. Hazrati[1], A. Nezami[2*], H. R. Khazaie[2], M. Parsa[3], E. Boroumand Rezazadeh[4]

Received: 12-08-2017
Accepted: 30-12-2017

Introduction: In Iran, clover is the second most important forage crop after alfalfa (*Medicago sativa*) and is cultivated on a surface of about 70,000 hectares. Yield improvement of this plant could be achieved through autumn cultivation. Iran is still one of the main centers for the diversity of clover species, there is not much information about freezing tolerance of native species of this important plant. Since freezing stress is one of the most important winter stresses which causes severe damage to the plant cells and tissues and ultimately plant death, evaluation of freezing tolerance of this crop could help to determination of the best planting date in order to achieve the highest yield. The aim of this study was to evaluate the freezing tolerance of four clover species through assessment of plant survival and re-growth after freezing stress.

Materials and Methods: In order to study growth criteria of four clover species after freezing stress in controlled conditions, an experiment was conducted in 2012-13 in Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Treatments were arranged as factorial based on Completely Randomized Design with four replications. Factors were included of planting dates (late September and late October), clover species (red clover *T. pratense*, white clover *T. repense*, Persian clover *T. resupinatum* (autumn species) and crimson clover *T. incarnatum* (spring species) and freezing temperatures (0 (control), -3, -6, -9, -12, -15, -18, -21ºC). Survival percentage, LT_{50} according to Survival (LT_{50su}), leaf area, Reduced 50% Leaf Area Temperature ($RLAT_{50}$), dry weight and Reduced Dry Matter Temperature 50 ($RDMT_{50}$) were measured after three weeks re-growth.

Results and Discussion: Results indicated that survival percentage was significantly affected by interaction of planting date, species and freezing temperatures. In both planting dates, crimson and white species showed a good survival till -15°C while they were killed as temperature was more decreased to -18°C. In first planting date, two species of red and Persian clover had 50 and 42% survival, but were killed in this temperature in the second planting date. The lowest LT_{50su} in autumn (red, white and Persian) and spring (crimson) species was found in first and second planting dates, respectively indicating higher freezing tolerance in crimson species at second planting date and a better acclimation of autumn species at first planting date which led to a higher survival compared to spring species. Leaf area was significantly affected by planting date, species and freezing temperatures at the end of the recovery period. In first planting date, decreasing temperature from zero to -18°C caused reduction of 98 and 48% of leaf area in red and Persian species while no plant of white and crimson species was survived in this condition. In second planting date, leaf area was decreased about 6, 33 and 2% as temperature decreased from zero to -15°C while leaf area of Persian species, not only was not decreased, but also increased by about 12%. The lowest and highest $RLAT_{50}$ were observed in Persian and red species. Interaction of planting date and species on $RDMT_{50}$ was significant in a way that in delayed planting date, $RDMT_{50}$ was increased in red, Persian and crimson species while it was decreased in white species.

Conclusions: Red and Persian species showed higher freezing tolerance according to indices of survival percentage and LT_{50su}. The highest recovery ability of plants based on leaf area per plant, $RLAT_{50}$, plant dry matter and $RDMT_{50}$ was found for second planting date. Also annual species of Persian and crimson had lower $RLAT_{50}$ and $RDMT_{50}$ and higher freezing tolerance compared to perennial species of red and white clover.

Keywords: Acclimation, Leaf area, Planting date, Recovery period, Survival

1- Former MSc student in agronomy, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2- Professor, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3- Associate Professor, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4- PhD in Agronomy, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding Author Email: nezami@um.ac.ir)